

Penyaringan Antikanser Ekstrak Etanol daripada Famili Piperaceae Terpilih dan Penentuannya melalui Pewarnaan Tripan Biru

(Anticancer Screening of Ethanol Extract from Selected Piperaceae Family and its Determination via Trypan Blue Staining)

WAN HAIFA HARYANI WAN OMAR, SHAHRUL HISHAM ZAINAL ARIFFIN*, ZAIDAH ZAINAL ARIFFIN, MUHD FAUZI SAFIAN, SAHIDAN SENAFI & ROHAYA MEGAT ABDUL WAHAB

ABSTRAK

Famili Piperaceae pada keseluruhannya terdiri daripada 1,000 hingga 2,000 spesies yang boleh dijumpai di kawasan tropika dan subtropika. Dalam kajian ini, ekstrak etanol digunakan untuk melihat aktiviti sitotoksik ke atas sel kanser hati manusia (HepG2) dan sel bukan kanser hati Chang melalui kaedah pengesanan MTT (3,4 [dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolium bromida). Sebanyak lapan spesies daripada famili Piperaceae telah terpilih untuk analisis aktiviti antitumor. Hasil kajian mendapati kesemua spesies Piperaceae (*P. sarmentosum*, *P. ramifilum*, *P. paucistigmum*, *P. betle*, *P. macronatum*, *P. ridleyi*, *P. magnibaccum* dan *P. miniatum*) menunjukkan aktiviti sitotoksik dengan ekstrak etanol Piper *sarmentosum* mempunyai nilai bacaan IC_{50} yang paling rendah ke atas sel HepG2 iaitu 12.5 $\mu\text{g/mL}$. Tiada aktiviti sitotoksik telah ditunjukkan oleh kesemua ekstrak etanol tumbuhan yang diuji aktiviti sitotoksik ke atas sel Chang kerana nilai bacaan IC_{50} kesemua ekstrak etanol yang diperlakukan ke atas sel Chang melebihi nilai piawai iaitu 30 $\mu\text{g/mL}$. Kaedah analisis viabiliti sel menggunakan tripan biru pula mendapati ekstrak etanol *P. sarmentosum* menurun secara signifikan ($p < 0.05$) terhadap sel HepG2 berbanding kawalan. Kesimpulannya, kaedah MTT menunjukkan kesemua ekstrak etanol famili Piperaceae memberikan aktiviti sitotoksik dan kaedah tripan biru merupakan kaedah alternatif bagi penentuan kesitotoksikan sesuatu ekstrak.

Kata kunci: Ekstrak etanol; HepG2; Piperaceae; sitotoksik

ABSTRACT

The Piperaceae family comprises about 1000 to 2000 of the species that are widely distributed in tropical and subtropical area. In this study, the ethanol extracts were used to evaluate the cytotoxic activity on human hepatocellular carcinoma (HepG2) and non-malignant Chang's liver cell lines by using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. Ethanol extracts from eight Piperaceae families were selected randomly. Results showed that all eight species (*P. sarmentosum*, *P. ramifilum*, *P. paucistigmum*, *P. betle*, *P. macronatum*, *P. ridleyi*, *P. magnibaccum* and *P. miniatum*) showed cytotoxicity activity with Piper *sarmentosum* exhibit higher cytotoxicity activity with the IC_{50} value at 12.5 $\mu\text{g/mL}$. On the other hand, there were no cytotoxicity activity of Chang's cell that could be induced by the ethanol extracts because the IC_{50} values for non-malignant Chang's cell were greater than 30 $\mu\text{g/mL}$. Viability analysis using trypan blue showed that *P. sarmentosum* ethanol extract produced significant ($p < 0.05$) decreased of HepG2 cells as compared to control ($p < 0.05$). In conclusion, all ethanol extracts selected randomly from Piperaceae family showed cytotoxic using MTT assay. Viability analysis using trypan blue staining demonstrates that this type of analysis can become an alternative approach in determining cytotoxicity activity of cells in the presence of extracts.

Keywords: Cytotoxic; ethanol extract; HepG2; Piperaceae

PENGENALAN

Famili Piperaceae merupakan tumbuhan yang menjalar dan memanjat pada batang pokok di sekelilingnya contohnya *P. magnibaccum*, *P. caninum* dan *P. porphyrophyllum*. Namun begitu, terdapat juga spesies yang tumbuh secara renek seperti *P. ridleyi*, *P. longamentum* dan *P. umbellatum*. Bentuk daunnya agak bujur dan mempunyai sifat aromatik. Ianya boleh dijumpai di tanah lembap dan memerlukan cuaca tropika untuk tumbuh dengan subur (Tawan et al. 2002). Genus *Piper* merupakan antara tumbuhan ubatan tradisi yang kerap digunakan oleh

masyarakat di Asia dan Kepulauan Pasifik (Bezzera et al. 2007) bagi mengubati penyakit seperti asma, demam, bronkitis, reumatisme (Bezzera et al. 2006), sakit perut, meredakan sakit dada, melegakan batuk dan mengubati pelbagai jenis penyakit kulit (Tawan et al. 2002). Di samping itu, ia juga digunakan sebagai bahan perasa dalam makanan dan juga agen kawalan serangga perosak (Thitima et al. 2004).

Kajian fitokimia telah mengenalpasti terdapat beberapa komponen kimia yang telah dipencilkan daripada famili Piperaceae ini iaitu amida tak tepu, flavonoid,

lignin, aristolaktam, ester, terpena, fenolpropenil dan alkaloid (Selene et al. 2007). Selain itu juga, genus *Piper* ini mempamerkan sebatian metabolit sekunder yang penting untuk tujuan pelbagai jenis aktiviti biologi lain seperti sebatian piperidina bagi aktiviti antifungal (Lago et al. 2009), sebatian asid benzoik untuk aktiviti antitumor (Baldoqui et al. 1999), sebatian aristolaktam untuk aktiviti antioksidan (Tabopda et al. 2008) dan sebatian flavanoid untuk aktiviti antiplasmodium (Portet et al. 2007).

Kajian lepas menunjukkan ekstrak metanol daripada spesies *Peperomia sui* mempunyai aktiviti sitotoksik yang signifikan terhadap titisan sel karsinoma manusia iaitu karsinoma nasofarinks (HONE-1) dan adenokarsinoma usus (NUGC-3) secara *in vitro* (Cheng et al. 2003). Kajian oleh Bezzera et al. (2007) pula telah menunjukkan sebatian pipartin daripada spesies *P. tuberculatum* mempunyai kesan antiproliferasi terhadap empat jenis titisan sel leukemia iaitu sel leukemia promielositik (HL-60), sel leukemia mielositik kronik (K562), leukemia sel T (Jurkat dan Molt-4). Hasil kajian di atas menunjukkan viabiliti keempat-empat jenis sel ini menurun secara signifikan ($p < 0.05$) apabila diperlakukan dengan sebatian pipartin berdasarkan dos dan masa. Nilai bacaan IC_{50} pada eraman 36 jam masing-masing adalah 2, 2.10, 1.51 dan 1.83 $\mu\text{g/mL}$ bagi HL-60, K562, Jurkat dan Molt-4 berbanding pada eraman 24 jam iaitu 5.28, 5.53, 2.49 dan 4.11 $\mu\text{g/mL}$.

Dalam kajian ini, sebanyak lapan spesies daripada famili Piperaceae telah dipilih secara rawak bagi penentuan potensi dalam aktiviti antikanser sel hati. Kelapan-lapan spesies ini akan disaring bagi menentukan kesan sitotoksik terhadap sel HepG2 dan sel Chang melalui kaedah pengasaian MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-difeniltetrazolium bromida). Sel HepG2 dipilih kerana ia merupakan model bagi titisan kanser hati yang selalu digunakan dalam kajian *in vitro* manakala sel Chang merupakan model *in vitro* bagi sel bukan kanser. Selain kaedah pengasaian MTT, peratus viabiliti sel HepG2 dan sel Chang dengan perlakuan ekstrak etanol *P. sarmentosum*, tamoksifen sebagai kawalan positif dan DMSO sebagai kawalan negatif akan dilihat melalui kaedah pewarnaan tripan biru. Sel HepG2 hanya diperlakukan dengan ekstrak etanol *P. sarmentosum* kerana nilai bacaan IC_{50} yang diperolehi melalui kaedah pengasaian MTT adalah paling rendah atau mempunyai aruhan sitotoksik yang paling tinggi di antara kelapan-lapan spesies. Walau bagaimanapun, sel Chang tidak akan diberi perlakuan dengan ekstrak etanol *P. sarmentosum* kerana tiada nilai bacaan IC_{50} yang diperolehi melalui kaedah pengasaian MTT. Analisis viabiliti sel Chang hanya akan diperlakukan dengan tamoksifen dan DMSO sahaja.

Oleh itu, tujuan kajian ini dijalankan adalah untuk mengenalpasti spesies-spesies daripada ekstrak etanol famili Piperaceae terpilih yang mempunyai aktiviti antikanser dan penentuan peratus viabiliti sel HepG2 melalui kaedah pewarnaan tripan biru.

BAHAN DAN KAEDAH

SUMBER TUMBUHAN

Kelapan-lapan sumber tumbuhan daripada bahagian daun iaitu *P. sarmentosum*, *P. ramifilum*, *P. paucistigmum*, *P. betle*, *P. macronatum*, *P. ridleyi*, *P. magnibaccum* dan *P. miniatum* diperolehi dari Institut Penyelidikan Perhutanan Malaysia (FRIM), Selangor.

PENGEKSTRAKAN TUMBUHAN

Sebanyak 100g serbuk daun yang telah dikisar direndam di dalam larutan etanol 100% semalaman dan dituras. Proses rendaman ini diulang sebanyak tiga kali. Ekstrak yang diperolehi kemudiannya dipekaskan dengan alat rotari evaporator (Buchii Rotavapor® R-200/205) pada suhu 40°C selama sejam bagi mendapatkan ekstrak etanol yang berupa cecair likat. Hasil pengekstrakan ini disimpan pada 4°C sehingga diperlukan.

PENGKULTURAN SEL

Sel HepG2 (Jin et al. 2000) dan sel Chang (Shantaram et al. 2000) dibekalkan oleh Dr. Nor Fadilah Rajab dari Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur. Kedua-dua sel ini dikulturkan dalam medium RPMI 1640 yang ditambahkan dengan 10% serum anak lembu dan dieram pada suhu 37°C dengan kelembapan 5% CO_2 . Sel akan disubkultur apabila mencapai kepadatan 70-80%.

PENGASAIAN MTT

Sebanyak 1×10^4 sel dimasukkan ke dalam setiap telaga bersama-sama 200 μL medium pertumbuhan dan 20 μL ekstrak etanol yang mengandungi kepekatan maksimum DMSO sebanyak 1% (v/v). Piring tersebut akan dieram semalaman di dalam inkubator bersuhu 37°C dengan 5% CO_2 bagi membenarkan pelekatan sel. Selepas dieram semalaman, sel diperlakukan dengan 20 μL larutan ekstrak etanol daripada kelapan-lapan spesies. Selepas dieram selama 24 jam, sebanyak 20 μL larutan MTT (2 mg/mL) (Sigma) ditambah ke dalam setiap telaga dan proses pengeraman akan diteruskan selama 4 jam. Selepas eraman, keseluruhan larutan MTT dan media dikeluarkan dari setiap telaga. Kemudian, sebanyak 200 μL larutan 100% (v/v) DMSO dimasukkan ke dalam setiap telaga sebelum piring mikrotiter dibaca pada jarak gelombang 540nm dengan menggunakan mesin pembaca ELISA (Biorad 680).

ANALISIS VIABILITI SEL MELALUI KAEDAH PEWARNAAN TRIPAN BIRU

Sebanyak 5×10^4 sel/mL ditumbuhkan dalam piring mikrotiter 24 telaga dan dieramkan semalaman bagi tujuan pelekatan sel dan dieram di dalam inkubator pada suhu 37°C dengan 5% CO_2 . Keesokan harinya, sebanyak lapan kepekatan bagi setiap sampel yang berbeza diperlakukan kepada sel dan tempoh pengeraman dilanjutkan lagi pada 24, 48 dan 72 jam. Selesai tempoh pengeraman, medium

lama akan dibuang dan sel akan dibasuh dengan 1X PBS. Kemudian 0.25% tripsin ditambah dan sel akan diaram dalam inkubator selama 2-3 minit bagi meleraikan sel. Apabila sel telah terlerai, medium baru ditambah dan sel diempar pada 1500rpm selama 5 minit. Kemudian sebanyak 10 μ L ampaian sel diambil dan ditambah dengan 10 μ L 0.4% tripan biru. Sebanyak 10 μ L daripada campuran ini dimasukkan ke dalam ruang antara sisip kaca hemasitometer untuk mengira bilangan sel viabel. Hemasitometer dilihat di bawah mikroskop cahaya pada kuasa pembesaran 100 \times .

ANALISIS STATISTIK

Nilai statistik bagi hasil eksperimen ditentukan oleh analisis varians (ANOVA) menggunakan Microsoft Excel 2007. Nilai $p < 0.05$ yang ditentukan merupakan nilai yang signifikan.

HASIL DAN PERBINCANGAN

KAEDAH PENGASAIAAN MTT

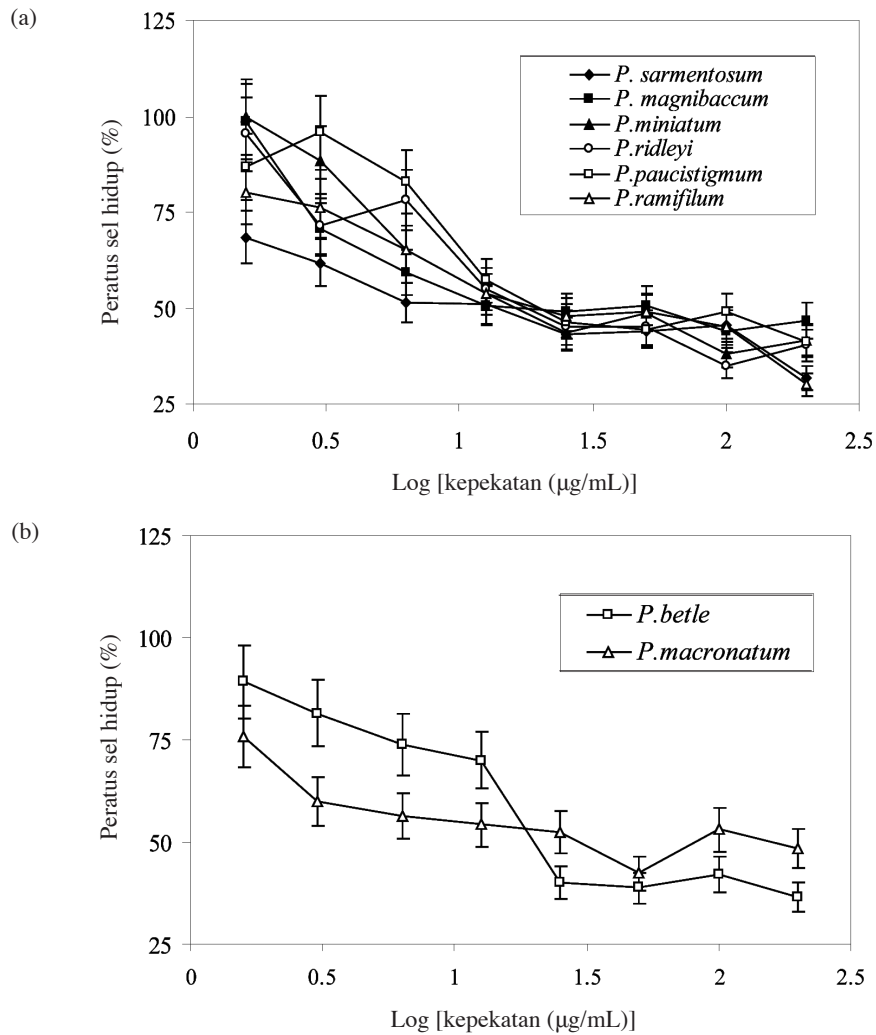
Aktiviti sitotoksik ekstrak etanol daripada famili Piperaceae ditentukan berdasarkan nilai bacaan IC_{50} ke atas titisan sel HepG2 dan sel Chang melalui kaedah pengasaian MTT. Nilai IC_{50} ialah kepekatan sampel yang akan menyebabkan 50% populasi sel mati. Kaedah pengasaian MTT ini adalah berdasarkan pengasaian kolorimetrik untuk mengira peratus sel hidup dimana warna kuning cincin tetrazolium yang larut air akan diturunkan kepada warna ungu formazan dengan enzim mitokondria dehidrogenase (Radoslaw et al. 2007). Jumlah formazan yang terhasil menunjukkan jumlah sel metabolit yang aktif. Kaedah pengasaian MTT ini digunakan secara meluas kerana ianya cepat, ringkas dan sensitif walaupun kosnya agak mahal. Kaedah pengasaian MTT ini juga sesuai untuk menganalisis jumlah sampel yang banyak (Fiona et al. 2005). Selain daripada kaedah pengasaian MTT, asai lain yang kerap digunakan bagi penentuan IC_{50} ialah (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-karboksिमेटोडifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium) (MTS) dan sulforodamina B (SRB) (Lee & Houghton 2005).

Rajah 1 (a) dan (b) menunjukkan bacaan nilai IC_{50} bagi lapan spesies daripada famili Piperaceae ke atas sel HepG2 selepas pengeraman 72 jam. Kelapan-lapan spesies tersebut ialah *P. sarmentosum*, *P. ramifilum*, *P. paucistigmum*, *P. betle*, *P. macronatum*, *P. ridleyi*, *P. magnibaccum* dan *P. miniatum*. Korakot et al. (2009), telah mengelaskan aktiviti sitotoksik kepada empat kumpulan iaitu nilai IC_{50} kurang daripada 20 μ g/mL dikategorikan sebagai paling aktif, julat antara 21 hingga 100 μ g/mL dikategorikan sebagai aktif, julat antara 101 hingga 1000 μ g/mL sebagai lemah dan lebih 1000 μ g/mL sebagai tidak aktif. Oleh itu, berdasarkan pengkelasan oleh Korakot et al. (2009) hasil kajian ini menunjukkan, ekstrak etanol *P. sarmentosum*, *P. magnibaccum*, *P. miniatum*, *P. ridleyi*, *P. paucistigmum* dan *P. ramifilum* dikategorikan sebagai paling aktif kerana nilai

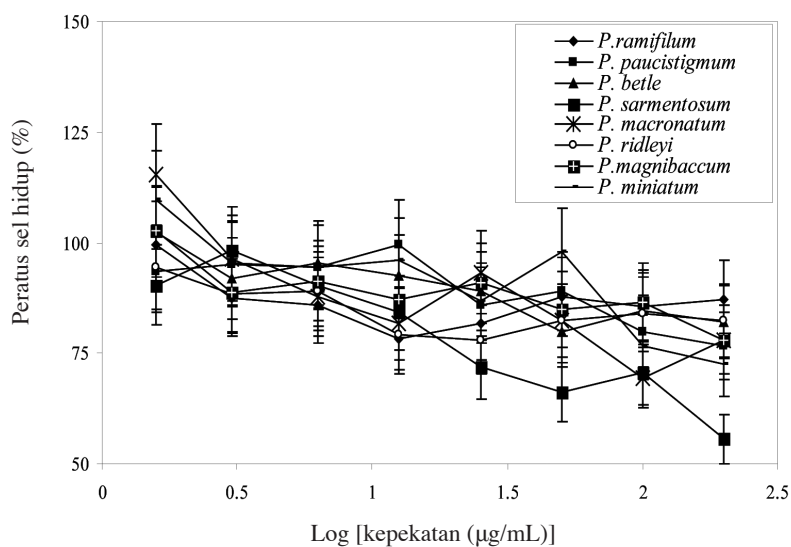
IC_{50} kurang 20 μ g/mL. Nilai bacaan IC_{50} yang diperolehi masing-masing ialah 12.5 μ g/mL (*P. sarmentosum*), 13.8 μ g/mL (*P. magnibaccum*), 15.8 μ g/mL (*P. miniatum*), 16.6 μ g/mL (*P. ridleyi*), 18.1 μ g/mL (*P. paucistigmum*) dan 18.6 μ g/mL (*P. ramifilum*) (Rajah 1a). Spesies *P. betle* dan *P. macronatum* pula dikategori sebagai aktif sahaja kerana nilai IC_{50} yang diperolehi berada dalam julat 21 hingga 100 μ g/mL. Nilai bacaan IC_{50} yang diperolehi pula masing-masing ialah 20.4 μ g/mL dan 21.9 μ g/mL (Rajah 1b). Walau bagaimanapun, *P. betle* dan *P. macronatum* masih berpotensi sebagai agen sitotoksik kerana nilai IC_{50} kurang daripada 30 μ g/mL. Bacaan nilai IC_{50} bagi kelapan-lapan spesies ini telah menunjukkan aktiviti sitotoksik ke atas sel HepG2 kerana nilainya kurang daripada 30 μ g/mL. Mengikut garis panduan yang telah ditetapkan oleh Institut Kanser Kebangsaan Amerika Syarikat pula, ekstrak yang mempunyai nilai IC_{50} kurang daripada 30 μ g/mL berpotensi sebagai agen sitotoksik (Athima et al. 2005). Dalam kajian ini, ekstrak etanol *P. sarmentosum* mempamerkan nilai bacaan IC_{50} yang paling rendah iaitu 12.5 μ g/mL berbanding spesies-spesies lain pada eraman 72 jam. Oleh itu, ekstrak etanol *P. sarmentosum* mempunyai aruhan sitotoksik yang paling tinggi diantara kelapan-lapan spesies daripada famili Piperaceae yang dianalisis.

Kajian penyaringan awal yang dijalankan oleh Akira et al. 2000 telah membuktikan terdapat beberapa spesies daripada famili Piperaceae yang berpotensi sebagai agen antitumor iaitu *P. sarmentosum*, dan *P. betle*. Dalam kajiannya, didapati ekstrak metanol daripada *P. sarmentosum* dan *P. betle* mempunyai aktiviti sitotoksik yang paling aktif terhadap sel B limfoblastoid manusia. Begitu juga hasil kajian awal yang dilakukan oleh Graham et al. (2000) telah membuktikan *P. boehmerifolium*, *P. sylvaticum* dan *P. latifolium* berupaya merencat titisan sel kanser payudara. Kesan antiproliferasi daripada famili ini juga turut dilaporkan secara *in vivo*. Bezzer et al. (2006) telah mendapati sebatian piperina yang dipencilkan daripada spesies *P. tuberculatum* memberikan kadar perencatan yang signifikan terhadap mencit betina Swiss aruhan tumor sarkoma 180 apabila diberikan dos pada kepekatan 50 mg/kg. Didapati berat tumor telah menyusut hampir 30% iaitu 1.41 ± 0.11 g berbanding kawalan iaitu 1.96 ± 0.16 g pada hari kelapan.

Aktiviti sitotoksik turut diuji ke atas sel Chang. Sel Chang merupakan model *in vitro* bagi sel bukan kanser. Rajah 2 menunjukkan bacaan nilai IC_{50} bagi lapan spesies terpilih daripada famili Piperaceae ke atas sel Chang. Berdasarkan rajah tersebut, didapati *P. sarmentosum*, *P. ramifilum*, *P. paucistigmum*, *P. betle*, *P. macronatum*, *P. ridleyi*, *P. magnibaccum* dan *P. miniatum* masing-masing tidak mempunyai kesan sitotoksik ke atas sel Chang kerana bacaan nilai IC_{50} masing-masing melebihi 200 μ g/mL. Tamoksifen pula dipilih sebagai kawalan positif dalam kajian ini kerana ia merupakan salah satu dadah kemoterapi yang kerap digunakan dalam rawatan kanser termasuk kanser hati. Hasil kajian mendapati bacaan nilai IC_{50} sel HepG2 dan sel Chang masing-masing ialah



RAJAH 1. Aktiviti sitotoksik ekstrak etanol *P. sarmentosum*, *P. magnibaccum*, *P. miniatum*, *P. ridleyi*, *P. paucistigmum* dan *P. ramifilum* adalah sangat aktif ($\leq 20 \mu\text{g/mL}$) (a) *P. betle* dan *P. macronatum* adalah aktif ($21\text{--}100 \mu\text{g/mL}$) (b) ke atas sel HepG2. Pengelasan (a) dan (b) dilakukan berdasarkan kajian Korakot et al. (2009). Setiap eksperimen dilakukan sebanyak tiga kali secara berasingan ($n=3$)



RAJAH 2. Aktiviti sitotoksik ekstrak etanol *P. sarmentosum*, *P. ramifilum*, *P. paucistigmum*, *P. betle*, *P. macronatum*, *P. ridleyi*, *P. magnibaccum* dan *P. miniatum* ke atas sel Chang. Nilai bacaan IC_{50} bagi ekstrak etanol masing-masing $> \log 2.3$ ($>200 \mu\text{g/mL}$). Ini menunjukkan kelapan-lapan spesies tidak memberikan aktiviti sitotoksik terhadap sel Chang. Setiap eksperimen dilakukan sebanyak tiga kali secara berasingan ($n=3$)

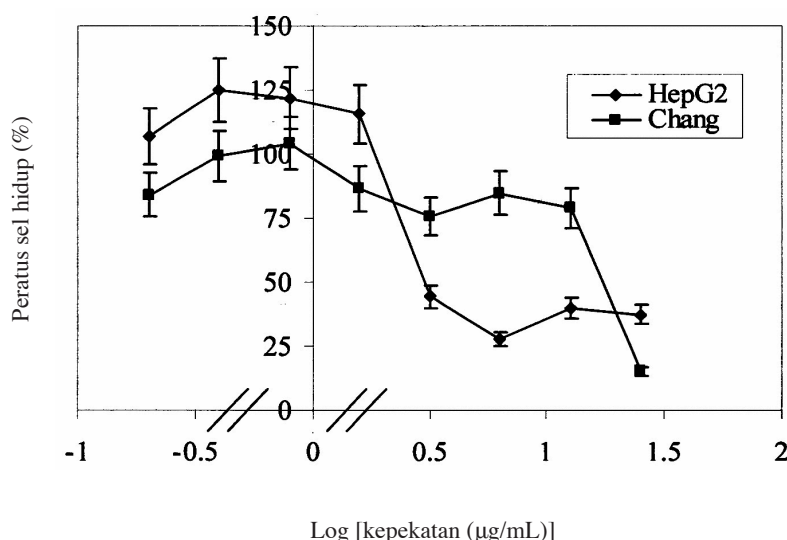
3 dan 18.6 $\mu\text{g/mL}$ (Rajah 3). Berdasarkan nilai IC_{50} didapati tamoksifen mempunyai ciri sitotoksik terhadap kedua-dua titisan sel HepG2 dan sel Chang. Aktiviti sitotoksik tamoksifen terhadap kedua-dua titisan sel HepG2 dan sel Chang ini mungkin menjadi penyebab kepada terhasilnya kesan sampingan apabila tamoksifen digunakan dalam jangka masa panjang. Pelbagai kesan sampingan seperti pendarahan pada vagina, keletihan dan kanser endometrium telah dilaporkan bagi pesakit yang menggunakan tamoksifen dalam jangkamasa yang panjang. Sel Chang yang merupakan sel normal turut membunuh sel dan memberikan kesan sampingan terhadap tisu normal apabila dirawat dengan tamoksifen (Senkus-Konefka 2004).

KESAN VIABILITI SEL DENGAN PERLAKUAN EKSTRAK ETANOL *P. SARMENTOSUM*, TAMOKSIFEN DAN DIMETILSULFOKSIDA (DMSO)

Analisis viabiliti sel dapat dilihat pada dua jenis titisan sel iaitu sel HepG2 dan sel Chang melalui pengiraan sel menggunakan tripan biru. Dalam kebanyakan kajian, analisis tripan biru digunakan untuk menentukan kebolehidupan sesuatu sel yang dipencilkan dari persekitaran *in vivo* ke persekitaran *in vitro* dan juga penentuan kadar proliferasi sesuatu sel yang dikulturkan secara *in vitro* (Intan et al. 2010). Kehilangan viabiliti sesuatu sel adalah disebabkan oleh kehilangan integriti membran. Oleh itu, apabila pewarna tripan biru menembusi sel, sel akan berwarna biru akibat dinding membran telah pecah dan telap kepada pewarna dan ini menunjukkan sel telah mati. Bagi sel yang hidup pula kelihatan cerah dan bersinar (McGahon et al. 1995). Peratus sel yang viabel dalam sesuatu populasi ditentukan dengan menggunakan hemasitometer di bawah mikroskop cahaya pada kuasa pembesaran 100 \times .

Sebelum kedua-dua titisan sel diperlakukan dengan ekstrak etanol *P. sarmentosum*, tamoksifen dan DMSO, sel terlebih dahulu diuji dengan menggunakan tripsin. Tujuan perlakuan dengan tripsin terhadap sel HepG2 dan sel Chang dilakukan adalah untuk menilai keterlibatannya di dalam proliferasi sel dan kepekatan 0.25% tripsin pula digunakan disebabkan kepekatan tersebut digunakan pada kesemua analisis viabiliti. Kedua-dua titisan sel dieram pada suhu 37°C dengan tempoh masa yang berbeza iaitu 2, 3, 4, 5 dan 10 minit. Rajah 4 menunjukkan kesan 0.25% tripsin terhadap sel HepG2 dan sel Chang. Daripada graf didapati bilangan sel HepG2 meningkat pada kehadiran 0.25% tripsin selama 2 dan 3 minit iaitu daripada 1.6×10^5 sel/mL kepada 1.7×10^5 sel/mL tetapi bilangan sel/mL didapati menurun pada 4, 5 dan 10 minit dengan bilangan sel masing-masing 1.4×10^5 sel/mL, 1.2×10^5 sel/mL dan 1.1×10^5 sel/mL. Walau bagaimanapun, analisis statistik telah menunjukkan kesemua peningkatan dan penurunan sel viabel adalah tidak signifikan ($p > 0.05$) berbanding bilangan sel viabel tanpa kehadiran tripsin. Hasil yang sama turut dapat dilihat pada sel Chang apabila diperlakukan dengan tripsin. Daripada rajah tersebut, dapat dilihat peningkatan bilangan sel secara tidak signifikan ($p > 0.05$) pada 2 dan 3 minit eraman dengan bilangan sel masing-masing 1.7×10^5 sel/mL dan 1.8×10^5 sel/mL. Pada tempoh 4, 5 dan 10 minit pula, bilangan sel semakin menyusut secara tidak signifikan ($p > 0.05$) dengan bilangan sel masing-masing 1.7×10^5 sel/mL, 1.5×10^5 sel/mL dan 1.3×10^5 sel/mL secara berurutan. Ini menunjukkan tripsin tidak pengaruh kepada peningkatan ataupun penurunan viabiliti sel HepG2 dan sel Chang walaupun telah dieram sehingga 10 minit.

Tamoksifen merupakan perencat kepada pengikatan estrogen terhadap reseptor estrogen (Sampson et al. 1997). Selain itu, tamoksifen juga merupakan dadah

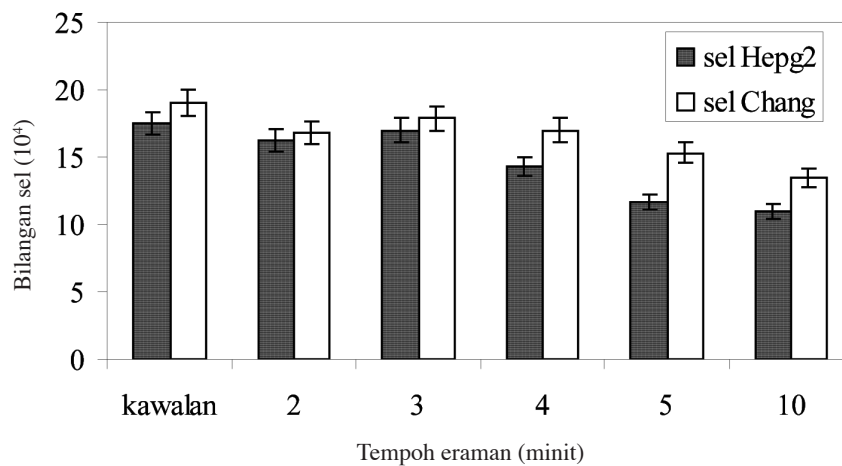


RAJAH 3. Aktiviti sitotoksik tamoksifen ke atas sel HepG2 dan sel Chang. Nilai bacaan IC_{50} tamoksifen ke atas sel HepG2 ialah log 0.48 (3 $\mu\text{g/mL}$) manakala bagi sel Chang pula ialah log 1.27 (18.6 $\mu\text{g/mL}$). Setiap eksperimen dilakukan sebanyak tiga kali secara berasingan ($n=3$)

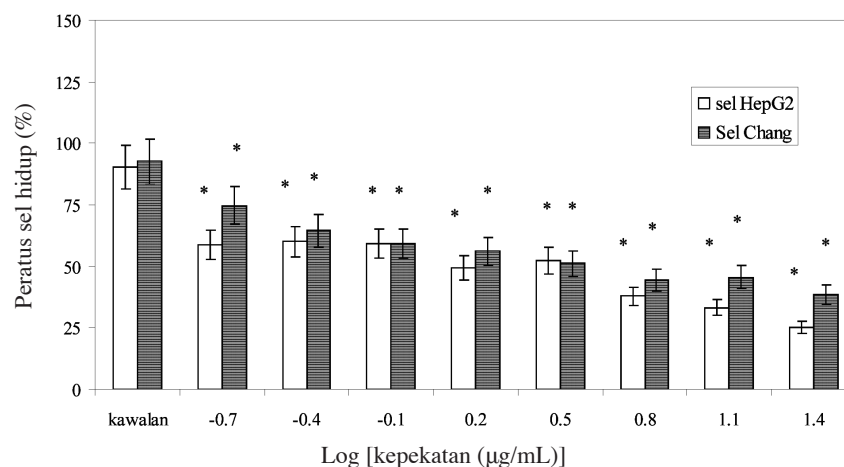
kemoterapi yang sering digunakan dalam merawat pelbagai jenis kanser termasuklah kanser hati (Guo et al. 2009). Oleh itu, dalam kajian ini, tamoksifen akan dijadikan sebagai kawalan positif terhadap analisis viabiliti sel HepG2 dan sel Chang menggunakan kaedah pewarnaan tripan biru. Rajah 5 menunjukkan analisis viabiliti sel titisan sel HepG2 dan sel Chang dengan perlakuan tamoksifen pada 72 jam. Sel diperlakukan dengan lapan kepekatan yang berbeza iaitu antara julat 0.2 hingga 25 $\mu\text{g/mL}$. Pada eraman 72 jam, didapati peratus viabiliti sel HepG2 dengan perlakuan tamoksifen juga menurun secara signifikan ($p < 0.05$) dengan nilai peratus 58.9% daripada pada 0.2 $\mu\text{g/mL}$ kepada 25.3% pada kepekatan 25 $\mu\text{g/mL}$. Viabiliti sel Chang juga turut turun secara signifikan ($p < 0.05$) iaitu 74.7% pada kepekatan 0.2 $\mu\text{g/mL}$ kepada 38.5% pada kepekatan 25 $\mu\text{g/mL}$. Didapati viabiliti sel semakin

turun apabila sel HepG2 dan sel Chang diperlakukan pada kepekatan yang makin tinggi.

Sampson et al. (1997) telah memberi perlakuan tamoksifen terhadap dua jenis sel kolangiokarsinoma iaitu jenis OZ dan SK-ChA-1. Hasil daripada kajiannya telah mendapati bilangan sel viabel bagi sel OZ dan SK-ChA-1 menurun secara signifikan ($p < 0.05$) apabila diperlakukan dengan tamoksifen pada empat kepekatan yang berbeza iaitu 1, 2.5, 5 dan 10 μM . Viabiliti sel ditentukan dengan menggunakan tripan biru pada hari ke 2, 4 dan 6. Selain daripada itu, tamoksifen juga didapati merencat pertumbuhan sel OZ dan SK-ChA-1 secara *in vitro* seiringan dengan pertambahan jumlah dos yang digunakan. Kajian oleh Robinson et al. (1998) menunjukkan bahawa viabiliti terhadap tiga jenis titisan sel kanser pankreas manusia iaitu Panc-1, HS 766T dan Panc-48 turut mengalami penurunan secara signifikan ($p < 0.05$) apabila diperlakukan dengan



RAJAH 4. Kesan 0.25% tripsin terhadap sel HepG2 dan sel Chang. Kedua-dua titisan sel ini di eram dengan tripsin selama 2, 3, 4, 5 dan 10 minit. Keputusan ini diperolehi melalui pengiraan purata daripada tiga eksperimen yang berasingan ($n=3$). Analisis ANOVA digunakan sebagai analisis statistik memberikan nilai $p > 0.05$ yang merupakan nilai tidak signifikan



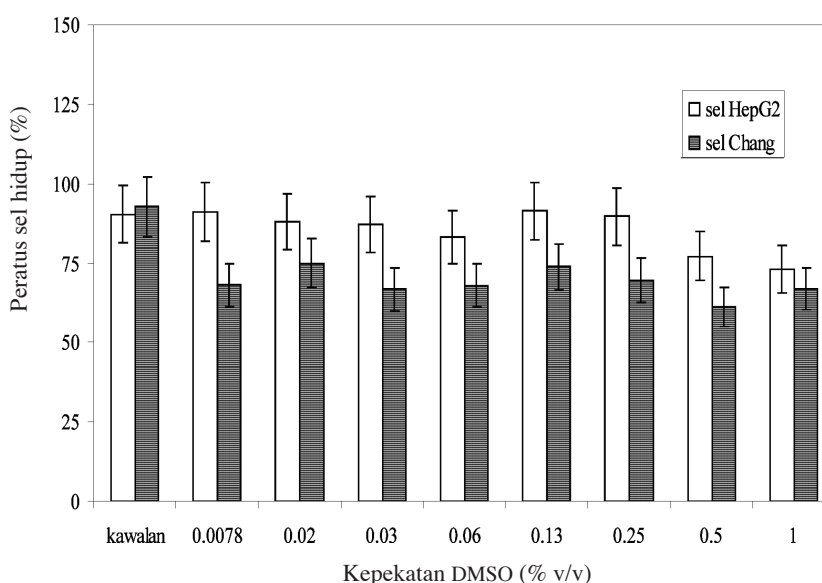
RAJAH 5. Analisis viabiliti sel menggunakan tripan biru ke atas sel HepG2 dan Chang dengan perlakuan tamoksifen pada 72 jam. Keputusan ini diperolehi daripada pengiraan purata dari tiga eksperimen yang berasingan ($n=3$). Analisis ANOVA digunakan sebagai analisis statistik. Simbol * memberikan nilai $p < 0.05$ yang merupakan nilai signifikan

tamoksifen pada enam kepekatan yang berbeza (1, 2, 4, 6, 8 dan 10 μ M) selama 4 hari.

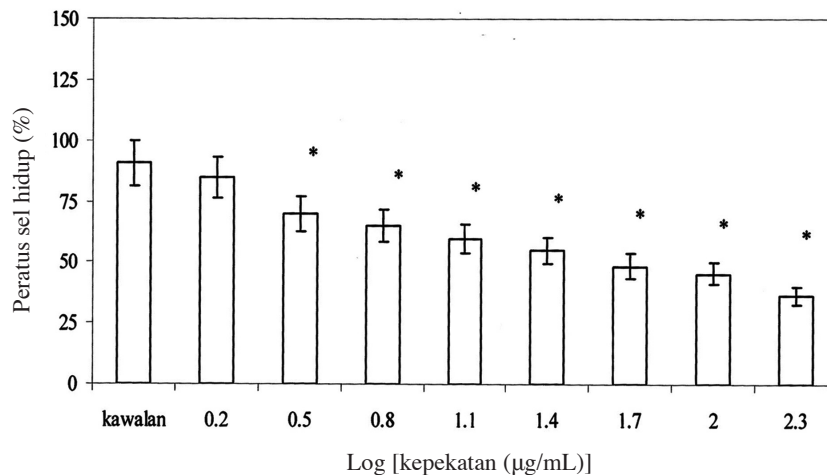
Dalam kajian ini juga, DMSO dijadikan sebagai kawalan negatif dan diperlakukan ke atas sel HepG2 dan sel Chang. DMSO dipilih sebagai kawalan negatif kerana ia hanya digunakan bagi melarutkan kelapan-lapan ekstrak etanol. Kepekatan maksimum DMSO yang digunakan ialah 1% (v/v). Dalam kajian ini, lapan kepekatan DMSO yang berbeza digunakan iaitu 0.0078%, 0.02%, 0.03%, 0.06%, 0.13%, 0.25%, 0.5% dan 1% (v/v) pada eraman selama 72 jam. Rajah 6 menunjukkan peratus viabiliti sel HepG2 dan sel Chang dengan perlakuan pelbagai kepekatan DMSO pada julat antara 0.0078% hingga 1% (v/v). Daripada Rajah 6 didapati tiada perubahan yang signifikan ($p>0.05$) terhadap peratus viabiliti sel HepG2 apabila diperlakukan dengan DMSO. Hasil sama juga dapat dilihat terhadap sel Chang pada julat kepekatan yang sama. Walau bagaimanapun, viabiliti sel HepG2 mempunyai peratusan viabiliti yang lebih tinggi berbanding sel Chang. Setiap kepekatan ini juga memberikan nilai peratusan viabiliti sel yang tidak signifikan ($p>0.05$) berbanding kawalan. Dalam kajian ini, kepekatan paling maksimum iaitu 1% (v/v) DMSO telah digunakan semasa pengesaian dilakukan. Oleh itu, kepekatan DMSO tidak memberikan kesan terhadap viabiliti sel HepG2 dan sel Chang walaupun pada kepekatan yang maksimum iaitu 1% (v/v). Kajian yang dilakukan oleh Fornoni et al. 2001 juga menunjukkan bahawa kepekatan DMSO pada 1% (v/v) tidak mempengaruhi pertumbuhan sel osteogenik mencit (MC3T3). Dalam kajiannya, didapati sel MC3T3 menunjukkan tiada perubahan secara signifikan ($p>0.05$) terhadap bilangan sel viabel apabila diperlakukan dengan 1% (v/v) DMSO selama 24, 48, 72, 96 dan 120 jam.

Kajian ini menunjukkan pendekatan viabiliti sel yang ditentukan berupaya untuk digunakan sebagai alternatif

bagi analisis penentuan sitotoksik sel terhadap sesuatu ekstrak. Analisis viabiliti menggunakan pewarnaan tripan biru dilakukan terhadap sel HepG2 yang diperlakukan dengan ekstrak etanol *P. sarmentosum*. Ekstrak etanol *P. sarmentosum* dipilih kerana ia telah menunjukkan nilai bacaan IC_{50} yang terendah atau aktiviti sitotoksik yang tertinggi di antara kelapan-lapan spesies famili Piperaceae yang telah dianalisis menggunakan kaedah pengesaian MTT. Sel HepG2 akan diperlakukan dengan ekstrak etanol *P. sarmentosum* dan analisis viabiliti sel akan ditentukan dengan menggunakan kaedah tripan biru. Rajah 7 menunjukkan analisis viabiliti sel HepG2 dengan perlakuan ekstrak etanol *P. sarmentosum* pada 72 jam. Sel HepG2 diperlakukan dengan lapan kepekatan yang berbeza iaitu antara julat 1.5 hingga 200 μ g/mL. Daripada graf tersebut, didapati viabiliti sel HepG2 semakin menurun secara signifikan ($p<0.05$) apabila bersandarkan kepekatan dan masa. Sel Chang pula tidak diperlakukan dengan ekstrak etanol *P. sarmentosum* kerana tidak memberikan nilai IC_{50} semasa penyaringan menggunakan kaedah pengesaian MTT. Dalam kajian yang dilakukan oleh Sunila et al. (2004), beliau telah memberi perlakuan ekstrak etanol *P. longum* ke atas dua jenis titisan sel iaitu sel Dalton limfoma ascit (DLA) dan sel karsinoma ascit (EAC). Kedua-dua titisan sel ini telah diperlakukan dengan tiga kepekatan ekstrak etanol *P. longum* iaitu 500, 250 dan 100 μ g/mL. Peratus sitotoksik bagi sel DLA yang diperlakukan dengan ekstrak etanol *P. longum* telah menunjukkan penurunan secara signifikan ($p<0.05$) iaitu 100% pada kepekatan 500 μ g/mL, diikuti dengan 50% pada kepekatan 250 μ g/mL dan seterusnya 12% pada kepekatan 100 μ g/mL. Begitu juga hasil yang telah dipamerkan oleh sel EAC yang turut menunjukkan penurunan apabila sel EAC diperlakukan dengan ekstrak etanol *P. longum*.



RAJAH 6. Analisis viabiliti sel menggunakan tripan biru ke atas sel HepG2 dan sel Chang dengan perlakuan DMSO pada 72 jam. Keputusan ini diperolehi daripada pengiraan purata dari tiga eksperimen yang berasingan ($n=3$). Analisis ANOVA digunakan sebagai analisis statistik memberikan nilai $p>0.05$ yang merupakan nilai tidak signifikan



RAJAH 7. Analisis viabiliti sel menggunakan tripan biru ke atas sel HepG2 dengan perlakuan ekstrak etanol *P.sarmentosum* pada 72 jam. Keputusan ini diperolehi daripada pengiraan purata dari tiga eksperimen yang berasingan (n=3). Analisis ANOVA digunakan sebagai analisis statistik. Simbol * memberikan nilai $p < 0.05$ yang merupakan nilai signifikan

KESIMPULAN

Kajian ini mendapati kelapan-lapan spesies terpilih ekstrak etanol daripada famili Piperaceae mempunyai aktiviti sitotoksik terhadap sel HepG2 kerana nilai bacaan IC_{50} yang diperolehi kurang daripada 30 µg/mL melalui kaedah MTT. Di antara kelapan-lapan spesies ini, *P. sarmentosum* memberikan nilai bacaan IC_{50} yang paling rendah iaitu 12.5 µg/mL. Analisis viabiliti sel menggunakan tripan biru pula mendapati ekstrak etanol *P. sarmentosum* memberikan penurunan yang signifikan ($p < 0.05$) terhadap peratus viabiliti sel HepG2 berbanding tanpa perlakuan. Oleh itu, analisis viabiliti menggunakan kaedah pewarnaan tripan biru juga boleh digunakan sebagai alternatif dalam penentuan aktiviti antikanser terhadap sesuatu ekstrak. Walau bagaimanapun, penentuan kepekatan dalam penentuan aktiviti sitotoksik masih perlu dikenalpasti dengan lebih tepat.

PENGHARGAAN

Pengarang utama bagi manuskrip ini adalah Shahrul Hisham, Z.A. dan Sahidan, S. bagi analisis saintifik manakala Zaidah, Z.A. pula merupakan pengarang utama bagi pendekatan pengekstrakan tumbuhan. Penyelidikan ini telah dibiayai oleh peruntukan UKM-OUP-TKP-17-81/2009 dan UKM-GUP-BTK-07-15-197 daripada Universiti Kebangsaan Malaysia.

RUJUKAN

- Akira, M., Abdul, M.A., Kamarudin, M.S., Koichi, K. & Hajime, O. 2000. Screening for the *in vitro* anti-tumor-promoting activities of edible plants from Malaysia. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 64: 9-16.
- Athima, S., Arunporn, I., Chawaboon, D., Chatchai, W., Niwat, K. & Pranee, R. 2005. Cytotoxic activity of Thai medicinal plants for cancer treatment. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 27(Suppl. 2): 469-478.
- Baldoqui, D.C., Kato, M.J., Cavalheiro, A. J., Bolzani, V.S., Young, M.C.M & Furlan, M. 1999. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper anducum*. *Pytochemistry* 51: 899-902.
- Bezerra, D.P., Castro, F.O., Alves, A.P.N.N., Pessoa, C., Moraes, M.O., Silveira, E.R., Lima, M.A.S., Elmiro, F.J.M. & Costa-Lotuf, L.V. 2006. *In vivo* growth-inhibition of sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 39: 801-807.
- Bezerra, D.P., Militão, G.C.G., Castro, F.O., Pessoa, C., Moraes, M.O., Silveira, E.R., Lima, M.A.S., Elmiro, F.J.M. & Costa-Lotuf, L.V. 2007. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. *Toxicology in Vitro* 21: 1-8.
- Cheng, M.J., Lee, S.J., Chang, Y.Y., Wu, S.H., Tsai, I.L., Jayaprakasam, B. & Chen, I.S. 2003. Chemical and cytotoxic constituents from *Peperomia sui*. *Phytochemistry* 63: 603-608.
- Fiona, M.Y., Wichaya, P. & Barbara, J.S.S. 2005. Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amiratz on the human lymphoblastoid cell line, WIL2NS. *Toxicology in Vitro* 19: 1051-1059.
- Fornoni, A., Cornacchia, F., Howard, G.A., Roos, B.A., Striker, G.A. & Striker, L.J. 2001. Cyclosporin A affect extracellular matrix synthesis and degradation by mouse MC3T3 osteoblasts *in vitro*. *Nephrology Dialysis Transplantation* 16: 500-505.
- Graham, J.G., Quinn, M.L., Fabricant, D.S. & Farnsworth, N.R. 2000. Plants used against cancer - An extension of the work of Jonathan Hartwell. *Journal of Ethnopharmacology* 73: 347-377.
- Guo, R., Huang, Z., Shu, Y., Jin, S. & Ge, H. 2009. Tamoxifen inhibits proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 via down-regulation of surviving expression. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 63: 375-379.
- Intan Zarina, Z.A., Shahrul Hisham, Z.A., Zaidah, Z.A. & Rohaya, M.A.W. 2010. Potential differentiation of three types primitive cells originated from different proliferation terms of mouse blood. *Sains Malaysiana* 39(2): 305-313.

- Jin, L., Han, M.S. & Choon, N.O. 2000. *Salvia miltiorrhiza* inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Cancer Letters* 153: 85-93.
- Korakot, A., Weerah, W., Puttinan, M., Prasat, K., Prasert, S., Ann, B. & Phil, J.W. 2009. *In vitro* screening for anthelmintic and antitumour activity of ethnomedicinal plants from Thailand. *Journal of Ethnopharmacology* 123: 475-482.
- Lago, J.H.G., Chen, A., Young, M.C.M., Guimara, E.F., Oliveira, A. & Kato, M.J. 2009. Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. DC. (Piperaceae). *Phytochemistry Letters* 2: 96-98.
- Lee, C.C. & Houghton, P. 2005. Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology* (100): 237-243.
- McGahon, A.J., Martin, R.P., Bissonnette, R.P., Mahboubi, A., Shi, Y., Mogil, R.J., Nishioka, W.K. & Green, D.R. 1995. The end of the (cell) line: Methods for the study of apoptosis *in vitro*. Dlm. *Methods in Cell Biology*. New York: Academic Press Inc.
- Portet, B., Fabre, N., Roumy, V., Gornitzka, H., Bourdy, G., Chevalley, S., Sauvain, M., Valentin, A. & Moulis, C. 2007. Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. *Phytochemistry* 68: 1312-1320.
- Radoslaw, P., Magdalena, P.K., Danuta, C., Krzysztof, S. & Krzysztof, G. 2007. Antiproliferative activity of various *Uncaria tomentosa* preparations on HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Pharmacological Reports* 59: 565-572.
- Robinson, E.K., Grau, M.A., Evans, D.B., Smith, C.M., Chiao, P.J., Abbruzzese, J.L. & Grimm, E. A. 1998. Cell cycle regulation of human pancreatic cancer by tamoxifen. *Annals of Surgical Oncology* 5: 342-349.
- Sampson, L.K., Vickers, S.M., Ying, W. & Phillips J.O. 1997. Tamoxifen-mediated growth inhibition of human cholangiocarcinoma. *Cancer Research* 57: 1743-1749.
- Selene, M.M., Valdir, A.F., Luciana, M.B., Eveline, S.B.C., Jo~ao, F.A.J., Silane, A.F., Edy, S.B. & Manoel, A.S.N. 2007. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* Species. *Biochemical Systematics and Ecology* 35: 670-675.
- Senkus-Konefka, E., Konefka, T. & Jassem, J. 2004. The effects of tamoxifen on the female genital tract. *Cancer Treatment Reviews* 30: 291-301.
- Shantaram, S.J., Charles, A.K., Manashi, B. & Debasis, B. 2000. Chemopreventive effects of grape seed proanthocyanidin extract on Chang liver cells. *Toxicology* 155: 83-90.
- Sunila, E.S. & Kuttan, G. 2004. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. *Journal of Ethnopharmacology* 90: 339-346.
- Tabopda, T.K., Ngoupayo, J., Liu, J., Mitaine-Offer, A.C., Tanoli, S.A.K., Khan, S.N., Ali, M.S., Ngadjui, B.T., Tsamo, E., Lacaille-Dubois, M.A. & Luu, B. 2008. Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. *Phytochemistry* 69: 1726-1731.
- Tawan, C.S., Ipor, I.B., Fashihuddin, B.A. & Sani, H. 2002. A brief account on the wild *Piper* (Piperaceae) of the Croker Range, Sabah. *ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC)*.
- Thitima, R., Puttan, S., Kanchanawadee, S., Chanika, W., Phongpan, R., Phaopong, W. & Apichart, S. 2004. Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*. *Journal of Ethnopharmacology* 93: 173-176.
- Wan Haifa Haryani Wan Omar, Shahrul Hisham Zainal Ariffin* & Sahidan Senafi
Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM)
Bangi, Selangor, Malaysia
- Zaidah Zainal Ariffin, Muhd Fauzi Safian
Fakulti Sains Gunaan, Universiti Teknologi MARA (UiTM)
Shah Alam, Selangor, Malaysia
- Rohaya Megat Abdul Wahab
Jabatan Ortodontik, Fakulti Pergigian
Universiti Kebangsaan Malaysia
Kuala Lumpur, Malaysia

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: hisham@ukm.my

Diserahkan: 20 Oktober 2009

Diterima: 21 Januari 2010